

## シイタケ(*Lentinus edodes*(Berk.)Sing)の多糖に関する研究

著者	志田 真理子
号	219
発行年	1981
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16705">http://hdl.handle.net/10097/16705</a>

氏 名 (本籍) し 志 だ 田 ま 真 り 理 こ 子

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 第 2 1 9 号

学位授与年月日 昭和 5 7 年 3 月 1 1 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 シイタケ (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing)  
の多糖に関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 松 田 和 雄 教授 足 立 達

教授 山 下 恭 平

# 論文内容要旨

## 第一章 緒 論

近年、酵母、糸状菌などの真菌類 (Eumycetes) の多糖に関する研究は、医学、生物学との関連、微生物の工業的利用の見地から広く進められている。特に醸酵工業に関連の深い酵母については、詳細な研究が行われ、主に細胞壁について、その構成成分の70~90%を占める多糖を中心としての全体像がほぼ組み立てられている。

一方、同じ真菌類に属する担子菌類 (Basidiomycetes) は、真菌の中で最も分化した組織を持ち、生活環の中に巨大な“キノコ”(子実体)という特徴的な世代を持つため、人類が古くから目にした微生物であるが、その化学的組成に関する研究は少ない。そこで本研究では、典型的な真正担子菌 (Eubasidiomycetes) であり、我が国で最も多く食用に供されているシイタケ (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing) を材料に取り上げ、子実体から多糖を抽出分画し、精製した多糖について、それぞれの詳細な構造を化学的手法を用いて検討し、シイタケ子実体中の多糖の全体的な構成を明らかにすることを目的とした。

シイタケの一般成分は炭水化物65%、タンパク質13%、脂質2%、灰分5%、水分15%(市販乾燥シイタケ)で、炭水化物が過半を占めており、トレハロース、マンニット、グルコースなどの低分子物質も含まれているが、多くは多糖として存在している。

担子菌類多糖に関する研究としては、Lindberg ら (1965~70) のサルノコシカケ科子実体のヘテロ多糖を中心とした研究、Wessels ら (1972~77) のスエヒロタケ培養菌体細胞壁多糖の研究が主なものである。また、シイタケ熱水抽出物から、Sarcoma-180 腹水癌の増殖をおさえるレンチナンと呼ばれる多糖が見出されてから、生理活性多糖検索の面からいくつかの研究が行われている。

本研究は新たに見出されたものを含めシイタケ子実体に含まれる7種の多糖の構造を明らかにし、今まで種々の担子菌で別々に明らかにされたいくつかの多糖が、微細構造に違いはみられても基本的には同一の構造をもち一つの担子菌の中に含まれており、これが担子菌多糖の普遍的な形態であることを示唆した点で意義がある。また担子菌多糖のもつ生理作用という面で、トリクロロ酢酸抽出により得られるガラクトース、マンノース、フコースを構成糖とするヘテロガラクトタンに、1-メチルアデニンによって誘起されるヒトデ卵母細胞成熟を阻害するという興味ある活性を見出し、その作用様式について検討した結果について述べる。

## 第二章 多糖の抽出

シイタケ子実体を冷3%トリクロロ酢酸、熱水、4%カセイソーダ、24%カセイソーダで順次抽出した。これは弱い条件から順に抽出することによって、後の多糖の分画を容易にするため、および、抽出される順序によって細胞中の多糖の存在状態を推定する一助とするためである。上記の溶剤による分画と、アルコール分画を組み合わせ、A～Jの10画分に分画した。これらの画分の構成糖はほとんどがグルコースであるが、他にガラクトース、マンノース、フコース、キシロースなども検出された。

## 第三章 グリコーゲン型多糖

子実体のトリクロロ酢酸抽出画分をアルコール分画 (MeOH <50%), セタブロン分画 (borate buffer pH10, ppt.) し得られたグリコーゲン型多糖の性質について検討した。この多糖はグルコースのみを構成糖とし、均一性を確認後、旋光度、IRで結合様式を調べたところ、 $\alpha$ -結合であった。ヨウ素反応で赤褐色を呈し、メチル化法、過ヨウ素酸酸化法で求めた平均鎖長は7であった。また、 $\beta$ -アミラーゼによる分解限度は35%であり、外部鎖長5、内部鎖長1～2と計算された。この種の多糖は広く真菌類に認められ、細胞内顆粒として存在する。担子菌ではサルノコシカケの一種である *Polyporus giganteus* から平均鎖長8～9のグリコーゲン型多糖が得られている。

## 第四章 ヘテロガラクトタン

### 第一節 ヘテロガラクタンの化学構造

トリクロロ酢酸抽出画分をアルコール分画 (MeOH 50–75%) 後、pHを変化させるセタブロン分画により精製されたヘテロガラクタンの化学構造について述べる。このヘテロガラクトタンはD-ガラクトース:L-フコース:D-マンノース=6.0:1.5:1.0で、 $[\alpha]_D^{20}=+102^\circ$ 、超遠心、電気泳動で均一性を検討した。メチル化分析および過ヨウ素酸酸化の結果、ガラクトースは1,6結合および2,6で分岐し、フコースおよびマンノースは非還元末端のみに存在することが推定された(表1)。

また、酸部分水解で $\alpha$ -1,6ガラクトオリゴ糖(2~4糖)が証明されたことから(表

表 1

Hydrolysis Products from the Methylated Heterogalactan				
Methylated sugars	Linkage indicated	Weight (mg)	Molar percentage	T <sub>9</sub> *
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -D-Man	Man <sup>1</sup>	171.8	11.6	1.43
2,3,4-Me <sub>3</sub> -L-Fuc	Fuc <sup>1</sup>		19.3	0.75
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -D-Gal	Gal <sup>1</sup>		0.8	1.79
2,3,4-Me <sub>3</sub> -D-Gal	<sup>6</sup> Gal <sup>1</sup>	223.7	40.3	8.11
3,4-Me <sub>2</sub> -D-Gal	<sup>6</sup> / <sub>2</sub> Gal <sup>1</sup>	139.5	27.1	
mono-Me-Gal		5.1	1.0	

\* : Relative retention time of the methyl glycosides to methyl-2,3,4,6-Me<sub>4</sub>- $\beta$ -D-glucoside

2), このヘテロガラクトンの構造は図 1 のように表わされる。ここで側鎖におけるガラクトースの有無, フコース, マンノースの配列順序, 主鎖に対する側鎖の結合のconfigurationは明らかでない。

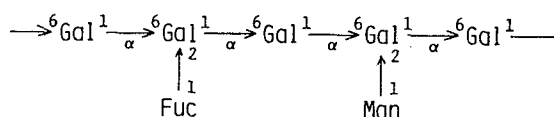
表 2

Oligosaccharides from the Partial Hydrolyzate

Oligosaccharides	Yield (mg)	[ $\alpha$ ] <sub>D</sub>	Partial hydrolysis
(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -galactobiose	44	139°	Gal, Gal <sub>2</sub> <sup>a</sup>
(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -galactotriose	50	147°	Gal, Gal <sub>2</sub> , Gal <sub>3</sub>
(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -galactotetraose	58	165°	Gal, Gal <sub>2</sub> , Gal <sub>3</sub> , Gal <sub>4</sub>

a: Gal<sub>2</sub> = (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -galactobiose and so on.

図 1



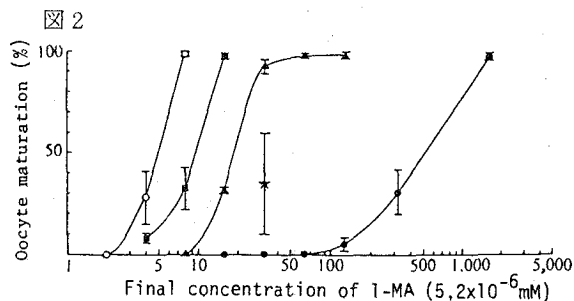
## 第二節 ヘテロガラクトンのヒトデ卵成熟阻害活性

ヒトデの配偶子放出が放射神経の水抽出物の注射によって誘起されることが見出され(1959), 棘皮動物の生殖生理学における糸口となった。その後の研究で, この物質は生殖巣に作用して第二次物質を生成し, これが配偶子放出および卵成熟を誘起する直接的な引き金物質であることが明らかとなった。この神経由来の活性物質(生殖巣刺激物質)は分子量約2100のポリペプチドであり, 一方, 二次物質(成熟分裂誘起物質)は1-メチルアデニン(1-MA)であることが知られている。

さて, 本節ではイトマキヒトデ卵において1-MAによって誘起される卵成熟をヘテロガラクトンが阻害することを見出し, そのレセプターが細胞表層にあることを推定した。この研究はレクチンの一種であるフィトヘマグルチニン(PHA-M)がヒトデ卵成熟を誘起するという事実からはじめられた。有効成分の分画中, PHA-M

中の一成分が逆に 1-MA の作用を阻害することを見出した。この成分は糖含量が高く、しかも構成糖はガラクトースが主であったので、ガラクトース含有多糖のモデルとして構造の分かったシイタケのヘテロガラクトタンを用いた。

$\text{Ca}^{++}$  欠除海水中で卵胞細胞を除いたヒトデ卵は、1-MA の終濃度  $4 \times 10^{-5} \text{mM}$  で 100% 卵成熟を起こしたが、これにヘテロガラクトタンを加えると卵成熟は阻害され、100% 卵成熟を起こす 1-MA の濃度は約 200 倍となった (図 2)。ヘテロガラクトタンの部分加水分解物である  $\alpha$ -1,6 ガラクトオリゴ糖にもポリマーよりは弱いが同様の活性が認められた。この活性が多糖やオリゴ糖の非特異的な吸着によるものでないこと



Dose-response curves of the starfish oocytes to 1-MA in the presence of  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-HGaln (FC, 0.83 %) (●), or  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-galactotetraose (FC, 0.83 %) (○), or in the absence of any sugars (▲). ■, Dose-response of the washed oocytes by HASW after incubation with 0.83 %  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-HGaln for 30 min at 0-4°C. Note the inhibitory effect of  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-HGaln and  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-galactotetraose on the oocyte maturation. At the star 192x(5.2x10<sup>-6</sup> mM) of 1-MA was mixed with 5%  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-HGaln at the same volume for about 1 h at 0-4°C, and 10  $\mu$ l of the mixture was added to 20  $\mu$ l of the starfish oocyte suspension in HASW.

表 3

Effect of the polysaccharides or monosaccharides that constitute  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-HGaln, or oligosaccharides from the partial hydrolyzate, on oocyte maturation induced by 1-MA in *Asterina pectinifera*.

Test samples	Oocyte maturation (%) mean $\pm$ s.e.
(A) $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Mannan	100 $\pm$ 0
Glycogen from rabbit liver	97.0 $\pm$ 1.3
Dextran T 40(MW,40,000)	98.0 $\pm$ 1.8
(B) D-Galactose	100 $\pm$ 0
D-Mannose	95.8 $\pm$ 3.4
L-Fucose	95.7 $\pm$ 2.3
(C) $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Heterogalactan	0 $\pm$ 0
$\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Galactobiose	3.4 $\pm$ 1.6
$\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Galactotriose	1.9 $\pm$ 1.6
$\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Galactotetraose	0 $\pm$ 0
(D) Maltose	100 $\pm$ 0
Maltotriose	98.9 $\pm$ 0.9
Maltotetraose	100 $\pm$ 0
Isomaltose	100 $\pm$ 0
Isomaltotriose	100 $\pm$ 0

を確認するために、他の多糖、オリゴ糖の影響を調べた (表 3) が、いずれにも阻害活性は認められなかった。

1-MA とヘテロガラクトタンによる 1-MA 阻害活性の作用部位は、1-MA とヘテロガラクトタンの extracellular

space での結合がみられないこと、卵をヘテロガラクトタンで処理した後、 $\text{Ca}^{++}$  欠除海水で洗浄したところ、1-MA に対する感受性の影響が消失していたことから、細胞表層であると推定された。また、

原形質膜上をおおっている卵黄膜を除くため、トリプシン処理した後、1-MAに対する感受性ならびにヘテロガラクトンの阻害作用を調べたところ、全く影響がみられないことから、レセプターは原形質膜上にあると推定された。

## 第五章 水溶性 $\beta$ -グルカン

熱水抽出画分をセタブロン分画 (borate buffer pH 10, sup.) して得られた $\beta$ -グルカンの性質について述べる。このグルカンは旋光度 ( $[\alpha]_D = -30^\circ$ ) と IR から $\beta$ -結合であり、均一性を確認した。m. w. 24000。メチル化分析および過ヨウ素酸酸化の結果、このグルカンは1,6結合を主とし、少量の1,3結合を含み、また約10%が3,6位で分岐していることが明らかとなった。 $\beta$ -1,6結合を主とするグルカンは担子菌では他に見出されていない。この多糖は後述する骨格多糖の一部の構造 (図4-Ⅱ) とよく類似している。

## 第六章 アルカリ可溶 $\beta$ -グルカン

4%アルカリ抽出、中和上清画分をセタブロン分画 (borate buffer pH 10, ppt.) して得られる $\beta$ -グルカンの性質について述べる。このグルカンは $\beta$ -結合であり、均一性を確認した。さらに exo- $\beta$ -1,3-glucanase を作用させるとグルコースとゲンチオビオースを2.6:1 (モル比) の割合で遊離し、約10%の切れ残り部分を生じた。(表4)。この結果、アルカリ可溶 $\beta$ -グルカンは基本的には図3-Iのような構造と

表4

	Degree of hydrolysis	glucose (%)	gentiobiose (%)	oligomer (%)	glc/genti (molar ratio)
Schizophyllan	74.6	51.1	48.2	0.7	2.12
G	71.0	52.1	39.1	8.8	2.66
E	70.5	51.3	38.8	9.9	2.64

考えられ、メチル化分析の結果とも一致する。また約10%の酵素で切れ残った画分は、1,6結合の含量が多く、分子内に一部1,6結合が密な部分が存在することが推定され、第9章で述べる骨格物質とのつながりが示唆された。

この $\beta$ -グルカンは上記の化学構造から抗腫瘍性多糖として知られるレンチナンと

同一物質と考えられ、実際、生物実験の結果強い抗腫瘍活性が確認された。上記の精製方法でこの $\beta$ -グルカンは子実体から7.8%の収量で得られ、千原らの報告の60倍であり、レンチナンが将来臨床に用いられる場合には非常に有効な調製法になると考えられる。

## 第七章 $\alpha$ -1,3グルカン

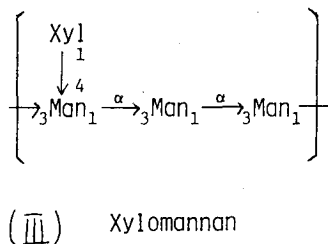
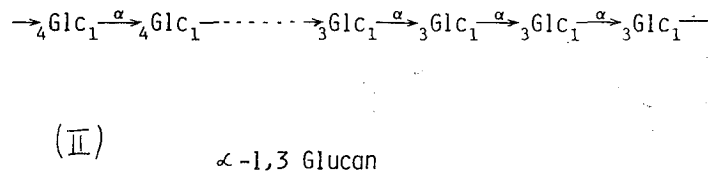
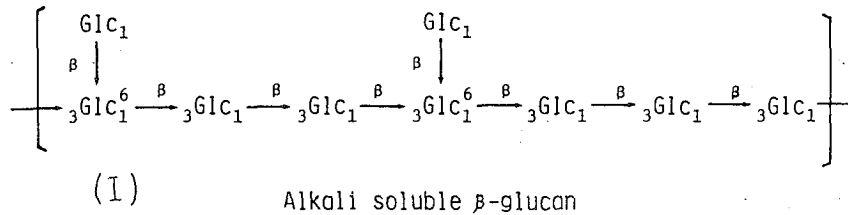
4%アルカリ抽出、中和沈殿画分をアルコール分画で精製して得た $\alpha$ -グルカン ( $[\alpha]_D^{25} = +258^\circ$ ) について述べる。均一性を確認後、過ヨウ素酸酸化、スミス分解、メチル化分析、酸部分水解などの結果から、この $\alpha$ -グルカンは1,3結合と1,4結合を5.3:1の割合で含み、主鎖の一部がC<sub>6</sub>位でわずかに分岐していることが明らかになった。スミス分解グルカンおよび $\alpha$ -アミラーゼ分解グルカンのゲル濾過は、もとのグルカンよりわずかに低分子化しているが、その多分散性に変化がないことから、1,4結合は多くは非還元末端付近にまとまって存在すると考えられる(図3-Ⅱ)。この型の多糖は担子菌ではスエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) および *Polyporus tumulosus* 菌体の細胞壁多糖として知られているが、これらのグルカンには1,4結合は含まれていない。

## 第八章 キシロマンナン

アルカリ抽出、中和沈殿画分からは第七章で述べた $\alpha$ -1,3グルカンと共にキシロマンナンが得られる。このキシロマンナン (マンノース:キシロース=2.7:1) は基本的には $\alpha$ -1,3結合のマンナン主鎖にキシロース1分子の側鎖を1,4結合を介して持つ構造であり(図3-Ⅲ)、ウロン酸を少量含んでいる。この種の多糖は担子菌では *P. tumulosus* 菌体に認められており、この他に異担子菌 (*Tremella* 属)、酵母 (*Cryptococcus* 属) に類似の多糖が報告されている。



図 3



## 第九章 骨格物質

4%カセイソーダ抽出残渣をさらに24%カセイソーダで徹底的に抽出して得た残渣画分を骨格物質として、この構造を検討し、構造解析から考えられる模式図を提表5

Identification of the Products Obtained from Bio-Gel P-2 Column

Fraction	Products	Yield (%) <sup>*</sup>
I	glucose	12.3
II	gentiobiose	8.4
III	gentiotriose	1.8
IV	gentiotetraose	1.4
V	gentiopentaose	1.5
VI	gentiohexaose	1.6
VII	gentioheptaose	1.9
VIII	higher oligo-saccharides	16.4
IX	void volume fraction	40.6

\* % of total effluents

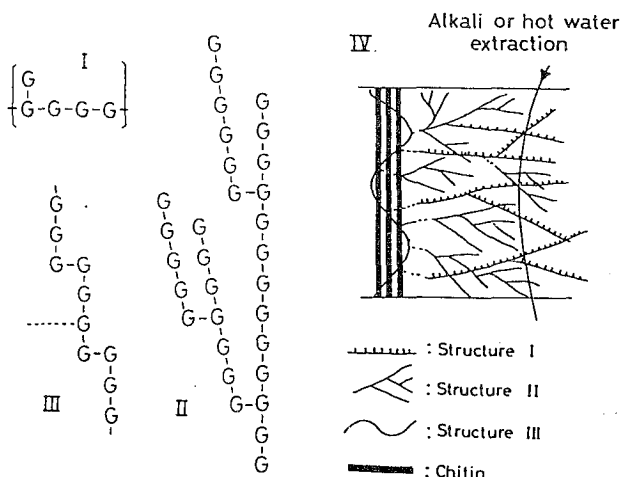
出した。

骨格物質は中性糖としてグルコースのみを含み、他に約30%のN-アセチルグルコサミンと少量のアミノ酸を含んでいる。メチル化分析で、1,6結合と1,3結合を約2:1の割合で含み、分岐の多い構造が推定された。骨格物質に *exo*- $\beta$ -1,3-glucanase を徹底的に作用させると、フェノール硫酸陽性物質の86%が可溶化し、可溶化物をゲル濾過で分離したところ表5

のようにグルコース、ゲンチオビオース、少量のゲンチオオリゴ糖の他に多量の(表 5-Ⅸ) ほとんど1,6結合から成る分岐のあるポリマー (m. w. 6000, 図 4-Ⅱ) が得られた。同じ酵素を弱い条件で作用させ、可溶化する生成物を経時的に分析すると、反応初期にはグルコース、ゲンチオビオースが多く遊離し、中期には上述のポリマー量が増加した。これらの結果から骨格物質の高分子としての全体像を考察した。すなわち、骨格物質の外側には図 4-Ⅰのようなアルカリ可溶性 $\beta$ -グルカン(=レンチナン)型の多糖が多く存在し、 $\beta$ -1,6結合を多く含む糖鎖部分(図 4-Ⅱ)は骨格物質の比較的内側に存在することが推定された。酸素反応不溶部(骨格物質の41%)は約2/3がキチン様物質から成り、また、中性糖部には図 4-Ⅲのように、1,6結合が多く存在することが示された。Exo- $\beta$ -1,3-glucanaseの作用機作から考えて、Ⅱがこの酵素の作用で分子中から切断されると考えるよりは、分子の一部Ⅰが酵素で除かれていくに従い、分子中にうめ込まれているⅡが可溶化してくると考えると理解しやすい。以上の考えに基き、現在筆者の考えているシイタケ細胞壁骨格物質の構造モデルを図 4-Ⅳに掲げた。Ⅰはレンチナン型糖鎖で、骨格物質の外

側にあり、この一部がアルカリ又は熱水で可溶化すると考えられる。レンチナン型糖鎖(第六章参照)には1,6結合がかたまって存在する部分があることが示唆されておりこの部分が骨格物質とレンチナン型糖鎖を結びつけている可能性も考えられる。

図 4



The proposed model of the core material of *L. edodes*. G-G,  $\beta$ -1,3 glucosidic linkages;  $\bar{G}$ ,  $\beta$ -1,6 glucosidic linkages.

I: The possible structure of the  $\beta$ -1,3 glucan with  $\beta$ -1,6 branches (lentinan type). This glucan mainly forms the outside part of the molecule.

II: One of the possible structure of the  $\beta$ -1,6 glucan (v. fraction in Table 5). This glucan is mainly present in the next part of the molecule.

III: The innermost part of the skeletal glucan, probably associated with chitin and amino acid polymer.

IV: Macromolecule of the core material.

## 第十章 総 括

本研究は代表的な真正担子菌であるシイタケ (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing) をとりあげ、その子実体中から新たに見出されたものも含め7種の多糖を分離、精製し(表6)その構造を明らかにした。また、この中のヘテロガラクトランについては、1-メチルアデニンによって誘起されるヒトデ卵成熟を阻害する活性を持つこと

表6

Yield of the polysaccharides from  
fruitbodies of *Lentinus edodes*

Polysaccharides	Yield (% to dry weight)
Glycogen	8.5
Heterogalactan	2.3
$\beta$ -1,6-Glucan	11.5
$\beta$ -1,3-Glucan	10.7
$\alpha$ -1,3-Glucan	5.1
Xylomannan	1.6
Skeletal glucan	6.7
Total	46.4

を見出した。アルカリ抽出残渣である細胞壁骨格物質については、構成する単位糖鎖の性質を明らかにし、他の $\beta$ -グルカンとの関係を考察しつつ、巨大分子としての考え得る模式図を提出した。また最後にシイタケ子実体に含まれる多糖と他の真菌類中の多糖をまとめて図表としてあらわした(本文中)。

## 審 査 結 果 の 要 旨

シイタケ (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.) は典型的な真正担子菌であり、わが国で最も多く食用に供されているキノコである。シイタケは、その構成成分の約70%を炭水化物が占めており、その大部分は多糖である。しかし、その化学構造に関しては、抗腫瘍活性を持つ多糖として知られるレンチナン以外はほとんど報告されていない。著者は先ずシイタケ子実体を冷トリクロロ酢酸、熱水、カセイソーダで順次抽出後、分画、精製した7種の多糖についてその構造を酸部分水解法、メチル化法、過ヨウ素酸酸化法、酵素分解法などの化学的手法を用いて明らかにした。すなわち、分岐の密なグリコーゲン型多糖、ガラクトース、フコース、マンノースを溝成糖とし、 $\alpha$ -1, 6 ガラクタンを主鎖とするヘテログラクタン、1, 6 結合を主とする水溶性 $\beta$ -グルカン、1, 3 結合を主とするアルカリ可溶性 $\beta$ -グルカン、 $\alpha$ -1, 4 結合を約15%含む $\alpha$ -1, 3 グルカン、 $\alpha$ -1, 3 マンナンを主鎖とするキシロマンナン、および $\beta$ -1, 6 1, 3 グルカンとキチン様物質から成るアルカリ抵抗性の細胞壁骨格物質の7種である。著者は上記の多糖のうちで特にアルカリ抽出残渣である細胞壁骨格物質について、構成する単位糖鎖の性質を明らかにしつつ、巨大分子として考える構造模式図を提出した。すなわち、骨格物質中の $\beta$ グルカン部分は均一な繰返し単位構造より成るのではなく、分子の外側はレンチナン型糖鎖、その内側は $\beta$ -1, 6 結合を主とする糖鎖、さらに内側は $\beta$ -1, 6 1, 3 グルカンとこれに密に結合しているキチン様物質から成るものと推察した。最後に著者は、担子菌多糖のもつ生理作用の一例として、トリクロロ酢酸抽出画分から得られるヘテログラクタンに、1-メチルアルデニンにより誘起されるヒトデ卵成熟を阻害するという興味ある活性を見出し、その作用部位についても検討を加えた。

以上、本論文は幾つかの新しい知見を含み、糖質生化学の分野に寄与するところ多大である。よって、審査員一同、著者は農学博士の学位を授与される資格を有するものと判定した。